

CN1468957

Title: Plasmid used as human therapeutic vaccine adjuvant
Application Number: 02136125 Application Date: 2002.07.19
Publication Number: 1468957 Publication Date: 2004.01.21
Approval Pub. Date: Granted Pub. Date:
International Classification: A61K39/36,A61P35/00,C12N15/11
Applicant(s) Name: Military Medical Univ. No.2, PLA
Address: 200433
Inventor(s) Name: Zhao Ping
Attorney & Agent: luo dachen
Abstract

The present invention provides one kind of high-copied and stable plasmid, which is prepared through combining oligonucleotide sequence ODN with immunostimulation to specific vector. The ODN inside the plasmid can stimulate immune cell without being modified with thiophosphate. The plasmid may be used as immune adjuvant and especially as adjuvant of therapeutic vaccine for treating hepatitis B and other chronic contagious diseases and tumors.

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/11

A61K 39/36 A61P 35/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02136125.8

[43] 公开日 2004 年 1 月 21 日

[11] 公开号 CN 1468957A

[22] 申请日 2002.7.19 [21] 申请号 02136125.8

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限公司

[71] 申请人 中国人民解放军第二军医大学

代理人 罗大忱

地址 200433 上海市杨浦区翔殷路 800 号

[72] 发明人 赵 平 戚中田

权利要求书 1 页 说明书 7 页

[54] 发明名称 一种用作人用治疗性疫苗佐剂的质粒

[57] 摘要

本发明提供一种将具有免疫刺激作用的寡核苷酸序列(ODN)与特定载体结合，制备高拷贝、能够稳定存在的质粒，质粒中的 ODN 不经过硫代磷酸修饰就有效激活免疫细胞，该质粒能够作为疫苗佐剂，尤其是能够作为治疗包括乙型肝炎等慢性传染病和肿瘤的治疗性疫苗的佐剂。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种质粒，其特征是由多拷贝的具有免疫刺激活性的核苷酸序列和载体序列组成。
2. 权利要求 1 所述的免疫刺激活性核苷酸序列包括含有 CpG，以磷酸二酯键相连能形成回文结构的 D 型寡核苷酸序列 ODN。
3. 权利要求 1 所述的免疫刺激活性核苷酸序列是 D 型 ODN，包括以下 3 种，
5'-GGTGCATCGATGCAGGGGG-3'，
5'-GGGGGACGATCGTCGGGGG-3'，
5'-ACCGATAACGTTGCCGGTGACGGCACCACG-3'。
4. 权利要求 1 所述的免疫刺激活性核苷酸序列的拷贝数在 20-40 个范围内。
5. 权利要求 1 所述的质粒在慢性病毒感染和肿瘤的治疗性疫苗中作为佐剂。
6. 权利要求 6 所述的质粒，具备 SEQ1 所述的结构。

一种用作人用治疗性疫苗佐剂的质粒

发明领域

本发明属于遗传工程，涉及疫苗和核苷酸分子。本发明涉及将具有免疫刺激作用的寡核苷酸序列（ODN）与特定载体结合，制备高拷贝、能够稳定存在的质粒，该质粒能够作为疫苗佐剂，尤其是能够作为治疗慢性传染病和肿瘤的治疗性疫苗的佐剂。

发明背景

近来的研究发现，来源于细菌基因组 DNA 的以非甲基化的胞嘧啶和鸟嘌呤（CpG）为核心的寡核苷酸序列（ODN）具有很强的免疫刺激作用，可有效激活哺乳动物的 B 细胞、NK 细胞和树突状细胞等免疫细胞，这些寡核苷酸序列表除了 CpG 核心外，CpG 两侧的核苷酸序列对于起免疫刺激作用也非常重要，并且决定其有效刺激的种属特异性，比如，可以活化小鼠免疫细胞的这类寡核苷酸对于人免疫细胞没有活性，而能有效激活人免疫细胞的寡核苷酸对小鼠免疫细胞的刺激作用不及对人免疫细胞的刺激作用。CpG 两侧的核苷酸序列还决定其不同的免疫刺激活性，目前发现两种以 CpG 为核心的 ODN 序列，其结构和功能特征分别为：K 型 ODN，含有一个或数个拷贝的 TCGTT 序列，其 5' 和 3' 末端均为胸腺嘧啶 T，且整个核苷酸链必须以硫代磷酸修饰，硫代磷酸修饰不仅可大大提高 ODN 对 DNA 酶的抗性，而且能大大提高其免疫刺激作用，对人免疫细胞起作用的代表性的 K 型 ODN 如：5'-TCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTGTT-3'。D 型 ODN，含有单拷贝的能形成回文结构的寡核苷酸序列，其中含有 CpG，以磷酸二酯键相连，若以硫代磷酸修饰则免疫刺激活性显著降低，该型 ODN 3' 末端多为多聚鸟嘌呤 G，对人免疫细胞起作用的代表性的 D 型 ODN 如：5'-GGTGCAATCGATGCAGGGGG-3'。这两种类型的 ODN 具有不同的免疫刺激功能：K 型 ODN 可多克隆激活 B 细胞，促进单核细胞增殖、分泌 IL-6，和分化成巨噬细胞；而 D 型 ODN 可刺激 NK 细胞分泌 IFN-γ，增强 NK 细胞的杀伤活性，促进单核细胞分化为具有高效抗原提呈活性的树突状细胞。

由于其能有效刺激和活化免疫细胞，上述 ODN 对于开发新的人用免疫佐剂有较好的应用前景。以 K 型或 D 型 ODN 为佐剂进行的小鼠、恒河猴和黑猩猩的动物实验表明，ODN 可以显著增强抗原诱导的体液和细胞免疫应答，而且安全性好，并且 D 型 ODN 作为疫苗佐剂所取得的免疫保护效果优于 K 型 ODN。

但是，目前的 ODN 发明都有一些问题。比如有的发明（人 CpG 寡脱氧核苷酸对质粒 DNA 免疫刺激活性的影响，中华医学杂志 2002 年第 82 卷第 7 期）先构建含有卡那霉素抗性基因和 puc 质粒复制起始点的质粒 pMini，再分别向该质粒中插入 9 和 16 个拷贝可刺激人免疫细胞的 K 型寡脱氧核苷酸 CpG 2006，发现随着插入 CpG 2006 拷贝数的增加，质粒在体外活化小鼠脾细胞分泌抗体的能力逐渐增强，但诱发 IFN- γ 的能力逐渐降低。用质粒作为乙肝表面抗原 HBsAg 的佐剂免疫小鼠，能明显提高小鼠的抗体水平，其功能在于对于体液免疫应答有促进作用，而对于细胞免疫应答的促进作用不明显，此外，K 型寡脱氧核苷酸只有经过硫代磷酸的修饰才有好的免疫刺激作用，而质粒在大肠杆菌杆菌中复制，不能进行硫代磷酸修饰，这也大大降低了其免疫刺激作用。使用卡那霉素抗性基因作为原核筛选标记，虽然符合美国 FDA 关于人用质粒的原核筛选标记要求，但卡那霉素抗性基因本身的分子量较大，插入 16 个拷贝寡脱氧核苷酸的质粒分子达到 2150 个脱氧核苷酸对。

用合成的含 CpG 的寡脱氧核苷酸加入商业化的乙型肝炎疫苗接种对该疫苗反应极低的猩猩，结果表明在疫苗中加入 CpG 寡脱氧核苷酸可显著提高猩猩的血清抗体阳转率和抗体滴度，表明 CpG 寡脱氧核苷酸作为疫苗佐剂可能作为乙型肝炎治疗有重要的应用价值。

分别用 K 型和 D 型含 CpG 的寡脱氧核苷酸作为利什曼原虫疫苗佐剂免疫恒河猴，检测恒河猴外周血单核细胞对利什曼原虫抗原的反应，结果 K 型 CpG 为佐剂免疫猴的外周血单核细胞能分泌高水平 IL-6，而 D 型 CpG 为佐剂免疫猴的外周血单核细胞能分泌高水平 IFN- γ 。用活利什曼原虫攻击免疫的恒河猴，结果 D 型 CpG 为佐剂的免疫保护效果优于 K 型 CpG 为佐剂的免疫保护效果。以上在灵长类动物的实验表明用含 CpG 的寡脱氧核苷酸作为疫苗佐剂能大大提高疫苗的免疫效率，对于一些用常规佐剂免疫效果差的疫苗或者作为治疗性疫苗的免疫佐剂有着很好的发展前景。

相关的文献均为用质粒作为 DNA 疫苗，而非作为单纯的免疫佐剂，或者用人工合成的寡脱氧核苷酸作为疫苗佐剂，未发现构建含有多拷贝免疫刺激寡脱氧核苷酸的质粒，以之作为疫苗佐剂的报道或专利。

发明目的

本发明的目的首先在于提供一种可以作为疫苗佐剂的寡脱氧核苷酸；其次是提供一种制备简单、稳定的寡脱氧核苷酸，尤其是提供一种以质粒形式存在的、能够在肿瘤和慢性传染病治疗性疫苗中使用的质粒；本发明的目的还包括提供非经过硫代磷酸修饰就有效激活免疫细胞，且在质粒中达到了多拷贝，更有效激活细胞免疫应答的治疗性疫苗佐剂。

技术方案

本发明使用了 3 种可刺激人体细胞免疫应答的 D 型 ODN 作为佐剂单元，构建成了一种含有多拷贝 D 型 ODN 的质粒。选择 D 型 ODN 而不选择 K 型 ODN 作为免疫刺激单位，是基于以下原因：1，D 型 ODN 能而 K 型 ODN 不能有效刺激单核细胞分化为树突状细胞，而树突状细胞为最强的抗原提呈细胞，对于激发细胞免疫应答尤其重要。2，D 型 ODN 能而 K 型 ODN 不能活化 NK 细胞及促进其分泌 IFN- γ ，IFN- γ 能诱导静止性 CD4+ T 淋巴细胞向 Th1 型分化和增强 CD8+ T 淋巴细胞的细胞毒活性，还可直接抑制病毒的增殖和肿瘤细胞的分裂。而慢性病毒感染者和肿瘤患者均表现为细胞免疫应答无能，增强其细胞免疫应答是公认有效的免疫治疗方法。3，K 型 ODN 需要硫代修饰才有效，这对于在细菌中自身复制的质粒是不可实现的。4，D 型 ODN 也能有效增强体液免疫应答，提高机体的抗体反应。

我们选择的 D 型 ODN 包括以下 3 种，均可激活人类免疫细胞。

5'-GGTGCATCGATGCAGGGGGG-3'，

5'-GGGGGACGATCGTCGGGGG-3'，

5'-ACCGATAACGTTGCCGGTGACGGCACCACG-3'，

本发明的 D 型 ODN 能够促进 NK 细胞分泌 IFN- γ 和促进单核细胞分化为树突状细胞，因此能增强细胞免疫应答，更适用于治疗性疫苗的佐剂，对于慢性病毒感染和肿瘤有应用价值。以 supF 基因作为原核筛选标记，分子量小，插入 30 个拷贝寡脱氧核苷酸的质粒分子由 1796 个脱氧核苷酸对组成。

技术效果

构建的质粒 pCG30 含有 3 种已经证明对人免疫细胞有高效激活作用的 D 型寡脱氧核苷酸，共 30 个拷贝，以其作为佐剂克服了用合成的寡脱氧核苷酸作为佐剂的不利。合成的寡脱氧核苷酸是单链 DNA，即使末端的脱氧核苷经过硫代磷酸修饰，在体内也易被降解，而将整个单链进行硫代磷酸修饰又大大降低了 D 型寡脱氧核苷酸的免疫激活作用，而质粒是双链 DNA，在体内的稳定性大大提高，此外，用这种质粒作为佐剂，使得制备过程极为简单，大大降低了成本。

将多拷贝的寡脱氧核苷酸集中于一个能在大肠杆菌中自主复制且纯化方便的质粒，不仅有免疫刺激活性，而且稳定性好，成本低廉，有很大的应用价值。含有多拷贝具有免疫刺激活性的核苷酸序列，可作为人用疫苗佐剂，尤其可作为慢性病毒感染和肿瘤的治疗性

疫苗佐剂：该类质粒不含有任何病毒相关核酸序列，安全性好；可以用四环素筛选，符合美国 FDA 关于人用质粒的有关筛选标志的要求；该质粒的分子量小，佐剂成分含量高。

实施例

材料

质粒 pcDM8、pcDNA3、大肠杆菌 MC1061/P3 均为美国 Invitrogen 公司产品；T 克隆载体 pMD18T 为 Takara 公司产品；Taqase DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶为 Sangon 生物工程有限公司产品；大肠杆菌 DH5 α 为本室常规保存；单链 DNA，包括 DNA 扩增引物由 Sangon 生物工程有限公司合成。

方法

PCR 扩增 puc 质粒的复制起始子序列

引物 1：5'-GAATTCAAGCTTCTGCAGGC GGCGAGCGGTATCAG-3'

引物 2：5'-CTCGAGCTAGCGTCGACTGCTGCTTGCAAAC-3'

在 0.5 毫升离心管建立以下反应体系：

pcDNA3 10 ng

10× Taqase 缓冲液 5 μ l

引物 1 (5 mM) 2 μ l

引物 2 (5 mM) 2 μ l

dNTP (10mM) 2 μ l

MgCl₂ (25 mM) 2 μ l

Taqase (2U/ μ l) 0.5 μ l

补充双蒸去离子水至总反应体积 50 μ l，在 PE2400PCR 热循环仪进行反应：先 94°C 变性 2 分钟，再 94°C 变性 40 秒，60°C 退火 40 秒，72°C 延伸 50 秒，共进行 30 个循环，然后 72°C 延伸 5 分钟，温度降至 4°C 结束反应。PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳，将目的条带回收。

目的基因与 T 克隆载体 pMD18T 连接

在 0.5 毫升离心管建立以下反应体系:

回收的 PCR 反应产物	6 μ l
5 \times T4 DNA 连接酶缓冲液	2 μ l
T 克隆载体 pMD18T	1 μ l
T4 DNA 连接酶 (2U/ μ l)	1 μ l

混匀, 置于 16°C 水浴 16 小时, 取 5 μ l 转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 得到的氨苄青霉素抗性菌落接种于含有氨苄青霉素 100 μ g/ml 的 LB 液体培养基, 再提取重组质粒进行酶切鉴定, 命名为 pMD18T-puc ori.

PCR 扩增 tRNA 抑制剂 supF 基因

引物 3: 5'-GAATTCTGGATCCGATTACCGCGGTCTTC-3'

引物 4: 5'- CTCGAGTCTAGAAAGCAGGGAGCAGAATC-3'

用质粒 pcDM8 为模板扩增 tRNA 抑制剂 supF 基因, 扩增产物回收后与 T 克隆载体 pMD18T 连接, 得到重组质粒 pMD18T-supF, 方法同上。

免疫刺激 ODN 的拼接

合成的 ODN1:

5'GTCGACTCTAGAAGCTTGGATCCGGTGCATCGATGCAGGGGGGGATGGGGGGACG
ATCGTCGGGGGGACCGATAACGTTGCCGGTGACGGCAC-3'

合成的 ODN2:

5'GCTAGCTCGAGCTGCAGAATTCCCCCGACGATCGTCCCCCATCCCCCTGCATC
GATGCACCCATCGTGGTGCCGTACCGGCAACGT-3'

合成的 ODN3:

5'-GTCGACTCTAGAAGCTTG-3'

合成的 ODN4:

5'-GCTAGCTCGAGCTGCAG-3'

在 0.5 毫升离心管建立以下反应体系:

ODN1 (1 mM)	1 μ l
ODN2 (1 mM)	1 μ l

10× Taqase 缓冲液	5μl
dNTP (10mM)	2μl
MgCl ₂ (25 mM)	2μl
Taqase (2U/μl)	0.5μl

补充双蒸去离子水至总反应体积 50μl，在 PE2400PCR 热循环仪进行反应：先 94°C 变性 2 分钟，再 94°C 变性 40 秒，60°C 退火 40 秒，72°C 延伸 20 秒，共进行 10 个循环，然后 72°C 延伸 5 分钟，温度降至 4°C 结束反应。

取上述反应产物 2μl，置于另一 0.5 毫升离心管，再加入：

10× Taqase 缓冲液	5μl
ODN3 (5 mM)	2μl
ODN4 (5 mM)	2μl
dNTP (10mM)	2μl
MgCl ₂ (25 mM)	2μl
Taqase (2U/μl)	0.5μl

补充双蒸去离子水至总反应体积 50μl，在 PE2400PCR 热循环仪进行反应：先 94°C 变性 2 分钟，再 94°C 变性 40 秒，60°C 退火 40 秒，72°C 延伸 30 秒，共进行 35 个循环，然后 72°C 延伸 5 分钟，温度降至 4°C 结束反应。PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳，将目的条带回收，含有 5 个 D 型免疫刺激 ODN 序列，与 T 克隆载体 pMD18T 连接，得到重组质粒 pMD18T-CpG5。

将质粒 pMD18T-puc ori 以限制性核酸内切酶 EcoRI、XhoI 消化，反应产物琼脂糖凝胶电泳，回收 puc 质粒的复制起始子序列 puc ori 基因；将质粒 pMD18T-supF 以限制性核酸内切酶 EcoRI、XhoI 消化，反应产物琼脂糖凝胶电泳，回收 tRNA 抑制子 supF 基因；将 puc ori 基因和 supF 基因用 T4 DNA 连接酶连接，再转化大肠杆菌大肠杆菌 MC1061/P3，得到重组质粒 puc-supF。

质粒 puc-supF 以 BamHI、EcoRI 消化，反应产物琼脂糖凝胶电泳，回收线性化质粒 puc-supF；质粒 pMD18T-CpG5 以 BamHI、EcoRI 消化，反应产物琼脂糖凝胶电泳，回收 CpG ODN；再将 CpG ODN 与线性化质粒 puc-supF 用 T4 DNA 连接酶连接，转化大肠杆菌大肠杆菌 MC1061/P3，得到重组质粒 pCG5。

质粒 pMD18T-CpG5 以 EcoRI、HindIII 消化，得到的 CpG ODN 插入质粒 pCG5 的 EcoRI、HindIII 位点，得到重组质粒 pCG10。

质粒 pMD18T-CpG5 以 HindIII、PstI 消化, 得到的 CpG ODN 插入质粒 pCG10 的 HindIII、PstI 位点, 得到重组质粒 pCG15。

质粒 pMD18T-CpG5 以 XbaI、XhoI 消化, 得到的 CpG ODN 插入质粒 pCG15 的 XbaI、XhoI 位点, 得到重组质粒 pCG20。

质粒 pMD18T-CpG5 以 XhoI、SalI 消化, 得到的 CpG ODN 插入质粒 pCG20 的 XhoI、SalI 位点, 得到重组质粒 pCG25。

质粒 pMD18T-CpG5 以 SalI、NheI 消化, 得到的 CpG ODN 插入质粒 pCG25 的 SalI、NheI 位点, 得到重组质粒 pCG30。pCG30 即为佐剂质粒。

该质粒由 1796 个核苷酸组成, 全部核苷酸序列 (SEQ1) 如下:

```

GGATCCGGTG CATCGATGCA GGGGGGGATG GGGGGACGAT CGTCGGGGGG ACCGATAACG
61   TTGCCGGTGA CGGCACCACG ATGGGTGCAT CGATGCAGGG GGGGATGGGG GGACGATCGT
121  CGGGGGGGAA TTCCCCCCCAGA CGATCGTCCC CCCATCCCCC CCTGCATCGA TGCAACCCATC
181  GTGGTGCCTG CACCGGCAAC GTATCGGTCC CCCCGACGAT CGTCCCCCCTA TCCCCCCCCCTG
241  CATCGATGCA CCGGATCCAA GCTTGGATCC GGTGCATCGA TGCAAGGGGG GATGGGGGG
301  CGATCGTCGG GGGGACCGAT AACGTTGCCG GTGACGGCAC CACGATGGGT GCATCGATGC
361  AGGGGGGGAT GGGGGGACGA TCCTGGGGGG GGAATTCTCTG CAGGCCGCGA GCGGTATCAG
421  CTCACTCAAA GCGGGTAATA CGGTTATCCA CAGAACGAGG GGATAACGCA GGAAAGAAACA
481  TGTGAGCAAA AGGCCAGCAA AAGGCCAGGA ACCGTAAAAA GGCCGCGTTG CTGGCGTTTT
541  TCCATAGGCT CCGCCCCCCT GACGAGCATE ACAAAAATCG ACGCTCAAGT CAGAGGTGGC
601  GAAACCCGAC AGGACTATAA AGATACCAGG CGTTTCCCCC TGGAAAGCTCC CTCGTGCGCT
661  CTCCTGTTCC GACCCCTGCCG CTTACCGGAT ACCTGTCCGC CTTTCTCCCT TCGGGAAAGCG
721  TGGCGCTTTC TCATAGCTCA CGCTGTAGGT ATCTCAGTTC GGTGTAGGTC GTTCGCTCCA
781  AGCTGGGCTG TGTGCACGAA CCCCCCGTTC AGCCCGACCG CTGCGCCTTA TCCGGTAACT
841  ATCGTCTTGA GTCCAACCCG GTAAGACACG ACTTATCGCC ACTGGCAGCA GCCACTGGTA
901  ACAGGATTAG CAGAGCGAGG TATGTAGGCG GTGCTACAGA GTTCTTGAAG TGGTGGCCCTA
961  ACTACGGCTA CACTAGAAGA ACAGTATTTG GTATCTGCGC TCTGCTGAAG CCAGTTACCT
1021  TCGGAAAAAG AGTTGGTAGC TCTTGATCCG GCAAACAAAC CACCGCTGGT AGCGGTTTTT
1081  TTGTTGCAA GCAGCAGCTA GCTCGAGCTG CAGAACCTCC CCGACGATC GTCCCCCCCAT
1141  CCCCCCTGCA ATCGATGCAC CCATCGTGGT GCGTCACCG GCAACGTATC GGTCCCCCCC
1201  ACGATCGTCC CCCCCATCCCC CCCTGCATCG ATGCACCGGA TCCAAGCTTC TAGAGTCGAC
1261  TCTAGAAGCT TGGATCCGGT GCATCGATGC AGGGGGGGAT GGGGGGACGA TCGTCGGGGG
1321  GACCGATAAC GTTGCAGGTG ACGGCACCCAC GATGGGTGCA TCGATGCAGG GGGGGATGGG
1381  GGGACGATCG TCGGGGGGGAA ATTCTGCAAG CTCGAGCTGC AGAATTCCCC CCGACGATCG
1441  TCCCCCCCAC CCCCCCTGCA TCGATGCACC CATCGTGGTG CCGTCACCGG CAACGTATCG
1501  GTCCCCCCCAGA CGATCGTCCC CCCATCCCCC CCTGCATCGA TGCACCGGAT CCAAGCTTCT
1561  AGACAGCTGG ATTACCGCGG TCTTCTCAA CGTAACACTT TACAGCGCG CGTCATTGAA
1621  TATGATGCGC CCCGCTTCCC GATAAGGGAG CAGGCCAGTA AAAGCATTAC CCGTGGTGGG
1681  GTTCCCAGGC GGCCAAAGGG AGCAGACTCT AAATCTGCCG TCATCGACTT CGAAGGTTCG
1741  AATCCTTCCC CCACCACCAT CACTTCAAA AGTCCGAAAG AATCTGCTCC CTGCTT

```